# 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析

周 燕 王明奎 廖 循 朱绪民 彭树林 丁立生<sup>\*</sup>

(中国科学院成都生物研究所,成都 610041)

摘 要 采用高效液相色谱-质谱联用方法分析了甘草(Gycyrhiza uralensis)中的化学成分。通过高效液相色 谱可将三萜、黄酮及香豆素等 50 余种化学成分较好的分离。根据紫外光谱可大致判断其化合物类型,由电喷 雾质谱得到各成分的分子量,再由串联质谱获得进一步的结构信息,进而推测出其中 22 个主要成分的可能结 构。它们分别是:葡糖基甘草甙、异光果甘草甙、夏拂托甙、甘草素-4-芹糖甙,甘草甙,6-乙酰甘草甙,异佛来 心甙,异甘草素葡萄糖芹菜甙,甘草糖甙A,甘草糖甙B,甘草素,3-O[-D·葡萄糖醛酸甲酯-(1 2)--D·葡萄糖 醛酸]-24-羟基-甘草内酯,甘草皂甙 E2,异甘草素,甘草醇,甘草酸,甘草香豆素,甘草双氢异黄酮,甘草异黄酮 甲,乌拉尔甘草皂甙乙,新甘草酚和甘草皂甙 B2。

关键词 甘草,化学成分,高效液相色谱-质谱联用

# 1 引 言

甘草为豆科植物甘草(Gycyrrhiza uralensis)、胀果甘草(G. inflata)和光果甘草(G. glabra)的干燥根及 根茎,是最常用的中药之一<sup>[1]</sup>。近年来,国内外学者已对十余种甘草属植物进行了化学成分的研究,从中 分离得到了一百多种化学成分<sup>[2]</sup>,其主要的化学成分为黄酮类和三萜化合物<sup>[3,4]</sup>,还有少量的生物碱<sup>[5]</sup>,木 质素和香豆素<sup>[6]</sup>等。甘草的化学成分比较复杂,而且由于品种和产地不同,其化学成分差异较大<sup>[2]</sup>。所 以,建立一个微量、快速的定性定量分析方法,对于其质量检测和控制具有重要的意义。虽然用 HPLC 能对 甘草化学成分进行较好的分离,但由于常规紫外检测所能提供的分子结构信息较少,故迄今为止主要用来 对甘草酸等特定成分进行分析和检测<sup>[7~11]</sup>。日本学者也曾用 HPLC 对甘草中的化学成分进行了分析,从 中鉴定了 17 个化合物<sup>[12]</sup>。本实验采用 HPLC/ ESFMS<sup>n</sup> 联用方法对东北产甘草的化学成分进行分析,以 ESFMS 获得的准分子离子峰确定化合物的分子量。根据多级质谱(ESFMS<sup>n</sup>)所得的碎片峰,结合紫外光 谱、HPLC 的保留时间以及参考文献报道共推测出 22 个化学成分的可能结构。

## 2 实验方法

### 2.1 仪器和材料

LCQ<sup>DECA</sup>型质谱仪(美国 Finnigan 公司),TSP 高效液相色谱,包括 AS3000 自动进样器,P4000 四元梯度 泵,带 PDA 的 UV6000LP 型紫外检测器。HPLC 流动相所用甲醇和乙酸为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2.2 样品处理

甘草样品购自内蒙古。取 0.5g 磨碎的甘草,加入 3 mL 50%甲醇放置 10 h,在超声波上超声提取 20 min,过滤。再分两次加入 2 mL 50%的甲醇超声提取 5 min 并过滤。合并滤液,定容至 10 mL 备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:ThermoQuest C<sub>18</sub>不锈钢柱,250 mm ×4.6 mm,5 µm 粒径;流动相:梯度洗脱,甲醇0.1%乙酸/ 水(1090)至(4060):0~20 min;(4060)至(8020),20~80 min;(8020)至(1000),80~120 min。流速:0.4 mL/min。柱温:室温。进样量:20 mL。

#### 2.4 质谱条件

ESI 源 ;源电压 :3.5 kV ;负离子检测 ;鞘气(N<sub>2</sub>) 流速 :80 a. u. ;辅助气(N<sub>2</sub>) 流速 :15 a. u. ;碰撞气体为 氦气 ;毛细管温度 :350 ;毛细管电压 : - 5 V。采用全离子扫描方式 ,扫描范围 m/ z 100~1300。MS<sup>n</sup> 碰

2003-01-01 收稿;2003-09-18 接受

撞能量:40%。

## 3 结果与讨论

以甲醇/0.1%乙酸水溶液为流动相进行线性梯度洗脱可得到较好的高效液相色谱分离效果(图 1)。 由于甘草中主要的化学成分是三萜皂甙、黄酮和香豆素化合物,其分子中的羟基很容易形成稳定的氧负离 子,所以用负离子电喷雾电离源作质谱检测所得总离子流图有较好的信噪比。HELC的 ESFMS 的总离子 流图(图 1a)与紫外全波长吸收(210~400 nm)及 240 ±0.5 nm 的单波长吸收所得色谱图(图 1b 和图 1c)基本 吻合,但总离子流图的基线噪声较大,分辨率也差一些。由于不同类型成分 MS 离子强度响应或是 UV 吸 收均有很大的不同,所以对于类型差异较大的甘草化学成分来说,用 MS 总离子流图或是 UV 色谱图的峰 面积归一化法来定量分析其成分的相对含量会有较大的误差,不过可作为一个大致的参考。



图 1 不同紫外波长检测的色谱图和质谱总离子流图



紫外检测波长为 330 nm 的色谱图 (liquid-chromatogram monitored at 330 nm); e. 紫外检测波长为 380 nm 的色 谱图 (liquid-chromatogram monitored at 380 nm)。

根据质谱(ESFMS)和串联质谱(ESFMS<sup>n</sup>),并结合 UV 谱图及文献报道,对甘草 HPLC 分离出的 50 余 个主要峰进行分析,大致确定了 22 个主要成分的可能结构。这些成分均在甘草属植物化学成分分析中 曾有报道,其中一些代表性的成分如甘草酸、甘草甙和甘草素等 7 个化合物,经该样品常规量柱色谱分 离纯化后,通过波谱分析进行了结构确证<sup>[13]</sup>。鉴定出的可能化合物的名称、紫外最大吸收、准分子离子 峰以及特征离子的多级质谱分析见表 1。本论文还对甘草主要化学成分三萜皂甙、黄酮和香豆素等各类 化合物的特征紫外光谱和质谱的一些规律作了总结。

#### 3.1 紫外光谱特征

无 , -不饱和酮结构的三萜皂甙在 230 nm 以上的吸收都很弱,具有 11-氧-12-烯 , -不饱和酮结构 的三萜皂甙在 230 nm 和 260 nm 附近有较强的紫外吸收,300 nm 以上则几乎没有吸收。黄酮类化合物 和香豆素在长波长紫外区有较强的吸收,其中黄烷酮由于 A 环和 B 环未形成共轭体系,故在 360 nm 波 长以上吸收较弱,可区别于黄酮、异黄酮、查尔酮和香豆素。图 1b 为全波长(210~400 nm)紫外吸收色 谱图;图 1c 为 240 ±0.5 nm 波长紫外吸收色谱图;图 1d 为 330 ±0.5 nm 波长紫外吸收色谱图;图 1e 为 380 ±0.5 nm 波长紫外吸收色谱图。根据紫外吸收规律,我们可知图 1e 应是甘草中黄酮、异黄酮、查尔 酮和香豆素成分的色谱图;图 1d 中扣除图 1e 中的峰后所余下的成分,大致应该是黄烷酮成分。同理图 1c 中扣除图 1d 的峰后所余成分,大致可归为三萜皂甙。当然这种分类是粗略的。另外有的峰可能会 是保留时间相近的两个以上成分的叠加。虽然各类成分的紫外吸收强度有很大差别,但同类成分的吸 收强度是相近的,将它们分门别类进行峰面积归一化定量,则能得到同类成分间的相对含量。

#### 3.2 黄酮类化合物的质谱特征

该类化合物的准分子离子[M+C]<sup>-</sup>、[M-H]<sup>-</sup>和[M+97]<sup>-</sup>比较明显,其中[M+97]<sup>-</sup>可能是 [M+HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>,可辅助分子量的确证。当样品浓度较高时,还易形成二聚体离子[2M-H]<sup>-</sup>,通过它们很 容易确定该类化合物的分子量。

黄酮和黄烷酮串联质谱的裂解方式与 EFMS 质谱基本类似。但由于在离子阱中离子寿命比 EI长 得多,所以易与中性分子形成加合离子。骨架裂解的碎片离子的水加合离子峰很强,成为特征碎片峰, 用于确定黄酮各环是否有羟基或甲氧基等取代基。

黄酮甙的多级质谱可得到逐个脱糖的碎片离子,其结果与 FAB-MS 相似。有时还能得到 C 环裂解 而糖保留的碎片离子,该离子可确定糖所在的环。糖完全离去后的甙元碎片的再次裂解与黄酮的裂解 规律完全相同,可用于推测黄酮甙元的结构。

查尔酮和黄烷酮互为异构体。如果只是 C 环 C<sup>—</sup>O 键开环而形成的异构体,则质谱图完全相同。 异黄酮的裂解与黄酮的裂解有较大差别。正离子 ESFMS<sup>n</sup> 多级质谱可以得到环裂解的碎片,对推测结 构有一定帮助。负离子 ESFMS<sup>n</sup> 多级质谱,最初发生一些小的中性碎片如 H<sub>2</sub>O、CO 等的丢失,其它碎片 则较复杂。具有异戊烯基侧链的异黄酮的正离子质谱中往往有丢失该特征碎片的峰[M - 55]<sup>+</sup>出现,可 作为确定有无异戊烯基侧链存在的一个依据。黄酮类化合物的裂解示例如图 2。



图 2 甘草甙的质谱裂解方式

Fig. 2 Fragment pathway of liquiritin

### 3.3 香豆素类化合物的质谱特征

准分子离子峰与黄酮的特点相同,出现[M+C]<sup>-</sup>、[M-H]<sup>-</sup>和[M+HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>准分子离子以及二聚体 [2M-H]<sup>-</sup>离子。甘草中香豆素大多有异戊烯基侧链,正离子 ESI 质谱可得到侧链断裂的碎片离子。该 类化合物的裂解示例如图 3。

#### 3.4 三萜皂甙类化合物的质谱特征

由于甘草中的三萜皂甙几乎含有葡萄糖醛酸,准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup> 很强,有时出现  $[M+Na-H]^{-}$ 、 $[M+K-H]^{-}$ 和 $[M+HSO_4-H]^{-}$ ,但几乎不出现 $[M+C]^{-}$ 。对于仅 C<sub>3</sub> 位接有糖链的三 萜皂甙,如果糖链中含有葡萄糖醛酸,则二级质谱中整个糖链部分形成的碎片一般为基峰,从其质量数

176

可推测糖的数目。另外,在二级质谱中还能观测到甙元的碎片离子峰。如果有酯糖结构,则二级质谱中 脱去酯链糖含甙元的离子峰为基峰,可能是因为酯糖链断裂后产生的羧基负离子较稳定,且酯甙键断裂 所需能量较三位糖甙键低的缘故。这可作为酯糖链存在的一个证据。进一步断裂生成的碎片与三位连



图 3 新甘草酚的质谱裂解方式

Fig. 3 Fragment pathway of neoglycyrol

糖甙的裂解方式相同。而糖取代位置的异构体在质 谱中没有区别。三萜皂甙的质谱裂解方式见图 3。



Table 1 The major components of glycyrrhiza uralensis



图 4 乌拉尔甘草皂甙乙的质谱裂解

Fig. 4 Fragment pathway of ural saponin B

编号 No.	保留时间 Retention time (min)	成分鉴定 Identification	紫外最大吸收 Maximum absorption wavelength <sub>max</sub> (nm)	电喷雾质谱 Eectrospray ionization mass spectra [M - H]	MS <sup>n</sup> 特征离子 MS <sup>n</sup> Characteristic ions		
3	16.6	葡糖基甘草甙[14] Gucoliquintin asio- side	232 , 265 , 313	711	549	255	135 *
5	20.6	异光果甘草甙[2] losliquiritoside	227 , 272 , 331	563	473	327	
6	21.3	夏拂托甙[2]Schaftoside	229 , 273 , 341 , 383	563	473		
8	23.2	甘草素-4 -芹糖甙[2] Iiquiritigenin-4 - Apiosyl(1 2)-glucoside	237 , 267 , 315	549	255	135	
9	23.9	甘草甙[13]Liquiritin	241 , 272 , 327	417	255	135	
10	24.7	6-乙酰甘草甙[2]6-Acetyliquiritin	230 , 258 , 277 , 320	459	255	135	
11	26.6	异佛来心甙[2]Isoviolanthin	228 , 272 , 332 , 382	577	487		
14	32.8	异甘草素葡萄糖芹菜甙[2] Licuraside	236 , 341 , 370 , 396	549	255	135	
15	34.2	甘草糖甙 A[4]Licorice-glycoside A	239 , 327 , 366 , 396	725	549	255	135
16	35.1	甘草糖甙 B[4]Licorice-glycoside B	241 , 315 , 341 , 396	695	549	255	135
17	35.7	甘草素[13]Liquiritigenin	236 , 272 , 315	255	135		
21	42.0	3-O-[-D-葡萄糖醛酸甲酯-(1 2) D-葡萄糖醛酸]-24-羟基-甘草内酯 [13]3-O-[-D-(6-methyl)glucuronopyra- nosyl(1 2)D-glucuronopyranosyl]- 24-hydroxy-glabrolide	202 , 246	835	659,	351	
26	50.6	甘草皂甙 E2[13]Licorice-saponin E2	248	819	643,	351	
27	51.8	异甘草素[13]Isoliquiritigenin	240 , 330 , 395	255			
32	63.3	甘草醇[13] Gycyrol	229 , 286 , 351 , 382	367	337	267	
37	70.4	甘草酸[13] Gycyrrhizic acid	246	821	645,	469	
39	73.1	甘草香豆素[2] Gycycoumarin	236 , 327 , 370 , 384	367	309	265	221
40	75.1	甘草双氢异黄酮[2]Licoisoflavanone	227, 260, 330	353	297	269	
43	79.3	甘草异黄酮甲[2] Licoisoflavone A	231 , 270 , 315 , 384	353	297	269	
45	81.6	乌拉尔甘草皂甙乙[2]Uralsaponin B	234 , 282	821	645	193	
47	84.1	新甘草酚[2]Neoglycyrol	232, 346, 365	365	307	279	251
48	85.1	甘草皂甙 B <sub>2</sub> [2]Licorice saponin B <sub>2</sub>	248	807	631,	351	

\*箭头"前后的数字分别表示串联质谱的母离子和子离子,第一个箭头后的数字表示由[M-H] 为母离子经二级质谱所得之 子离子(the figures before and after the arrow "" represent the parent ions and daughter ions of tandem mass spectra, respectively; the figures after the first arrow are the daughter ions obtained from the parent ions of secondary mass spectra)

### 178

#### References

- Editorial Committee of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Second Part)(中华人民共和国药典(二部)). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工 业出版社), 2000: 65~66
- 2 Hu Jinfeng (胡金锋), Shen Fengjia (沈凤嘉). Natural Products Research and Development (天然产物研究与开发), 1996, 8 (3): 77~91
- 3 Liu Qin (刘 勤), Liu Yonglong (刘永隆). Acta Pharmaceutica Sinica (药学学报), 1989, 24 (7): 525~531
- 4 Hatano T, Takagi M, Ito H, Yoshida T. Phytochemistry, 1998, 47(2): 287~293
- 5 Kang Hyung Tai. Chungang Uihak, 1996: 515
- 6 Wang Cailan (王彩兰), Zhang Ruyi (张如意), Han Yongsheng(韩永生). Acta Pharmaceutica Sinica (药学学报), 1991, 26 (2): 147~151
- 7 Wang Jingzhu (王静竹), Chen Dingyi (陈定一), Zhao Xianhong (赵现红). China Journal of Chinese Materia Medica (中国中 药杂志), 1995, 20 (9): 535~536
- 8 Shibano M, Henmi A, Matsumoto Y, Kusano G, Miyase T. Hatakeyama Yoshio. Heterocycles, 1997, 45 (10): 2053 ~ 2060
- 9 Zhang Guogang(张国刚), Xu Suixu(徐绥绪), Jin Fenghuan(金凤环), Zhou Xuemei (周雪梅). Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报), 1999, 16 (1): 65~67
- 10 Cao Peixue(曹佩雪) Jian Fengyun(鞯风云). Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2001, 32 (1): 981~983
- 11 Yamamoto Y, Tani T. Wakan Iyakugaku Zasshi, 2001, 18(5): 197~202
- 12 Shibano M, Matsumoto Y, Kusano G, Shibata T. Nat. Med., 1996, 50 (4): 273 ~ 283
- 13 Zhu Xumin (朱绪民), Di Yingtong (邸迎彤), Peng Shulin (彭树林), Wang Mingkui (王明奎), Ding Lisheng (丁立生). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **2003**, 34: 198
- 14 Kitagawa I, Chen W Z, Hori K, Harada E, Yasuda N, Yoshikawa M, Ren J. Chem. Phann. Bull., 1994, 42: 1056

# Rapid Identification of Compounds in Glycyrrhiza Uralensis by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry

Zhou Yan, Wang Mingkui, Liao Xun, Zhu Xumin, Peng Shulin, Ding Lisheng<sup>\*</sup> (Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract The chemical constituents of *Glycyrrhiza uralensis* were first analyzed by high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESFMS<sup>n</sup>). Above fifty major components, including triterpenoid saponins, flavonoids and coumarins, were isolated. Among them, twenty-two were identified as glucol-iquiritin asioside, iosliquiritoside, schaftoside, liquiritigenin-4-apiosyl (1 2)-glucoside, liquiritin, 6-acetyliquiritin, isoviolanthin, licuraside, licorice-glycoside A, licorice-glycoside B, liquiritigenin, 3-O-[ -D-(6-methyl) glucuronopyranosyl (1 2)- -D-glucuronopyranosyl]-24- hydroxy-glabrolide, licorice-saponin  $E_2$ , isoliquiritigenin, glycyrol, glycyrrhizic acid, glycycoumarin, licoisoflavanone, licoisoflavone A, uralsaponin B, neoglycyrol and licorice saponin  $B_2$  by the ESFMS, ESFMS<sup>n</sup> and ultraviolet (UV) spectra.

Keywords Gycyrrhiza uralensis, structure elucidation, liquid chromatography/tandem mass spectrometry

(Received 1 January 2003; accepted 18 September 2003)